

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Factores demográficos que afectan los niveles de estrés del mono
aullador negro (*Alouatta palliata aequatorialis*)**

Jennifer Irene Balseca Córdova

Biología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Bióloga

Quito, 25 de diciembre de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Factores demográficos que afectan los niveles de estrés del mono aullador
negro (*Alouatta palliata aequatorialis*)**

Jennifer Irene Balseca Córdova

Nombre del profesor, Título académico

Stella de la Torre, PhD

Quito, 25 de diciembre de 2020

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Jennifer Irene Balseca Córdova

Código: 00132544

Cédula de identidad: 0930315841

Lugar y fecha: Quito, 25 de diciembre de 2020

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETheses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETheses>.

RESUMEN

El mono aullador negro, *Alouatta palliata aequatorialis*, es un primate de la familia Atelidae. Esta especie está distribuida desde el sureste de México y Guatemala hasta la costa occidental de Colombia y Ecuador. Habita en una gran variedad de ecosistemas, como bosques húmedos, secos y semihúmedos. Actualmente los aulladores negros sufren de una pérdida de su hábitat causada por una rápida deforestación y fragmentación, por lo que la categoría de esta especie es En Peligro. El objetivo de mi estudio fue comparar los niveles de cortisol obtenidos de muestras de heces de individuos de tres poblaciones de la costa del Ecuador y relacionarlos con factores demográficos, como el tamaño y composición grupal y el número de grupos por localidad, para evaluar si estas variables influyen sobre el nivel de estrés de los individuos. Se tomaron datos de tamaño y composición grupal y muestras de heces de individuos de *A.palliata* en Pacoche, Puyango y Lalo Loor. El cortisol fecal, como indicador del nivel de estrés, fue medido mediante ensayos de inmunoanálisis (EIA). Los grupos de Lalo Loor son los que presentan niveles de cortisol fecal más altos y significativos, en comparación con las otras dos localidades. Las correlaciones entre los niveles de cortisol y las variables demográficas sugieren que las diferencias en composición grupal no tienen una influencia en los niveles de estrés. Sin embargo, si existe una influencia del número de grupos por localidad en los niveles de cortisol. Otros factores, como la deforestación, fragmentación de hábitat y entre otras causas, también influyen en los niveles de cortisol y estrés de los monos aulladores negros. Esta es una investigación realizada bajo el contrato marco de acceso a recursos genéticos MAE-DNB-CM-2016-0046-M-0002 otorgado a Stella de la Torre.

Palabras clave: *Alouatta palliata*, mono aullador negro, niveles de estrés, cortisol fecal, factores demográficos, Puyango, Pacoche, Lalo Loor, Ecuador.

ABSTRACT

The black howler monkey, *Alouatta palliata aequatorialis*, is a primate of the Atelidae family. This species is distributed from southeastern Mexico and Guatemala to the western coast of Colombia and Ecuador. It inhabits a wide variety of ecosystems, such as humid, dry, and semi-humid forests. Currently, the black howlers suffer from a loss of their habitat caused by rapid deforestation and fragmentation, so this species is considered to be Endangered. The objective of my study was to compare the cortisol levels obtained from stool samples of individuals from three populations on the Ecuadorian coast and relate them to demographic factors, such as group size and composition and the number of groups per location, to assess whether they are variables influence the stress level of individuals. Demographic data and fecal samples were taken from groups in Pacoche, Puyango and Lalo Loor. Fecal cortisol was measured as an indicator of stress levels, through immunoassay tests (EIA). The Lalo Loor monkeys has significantly higher cortisol levels, compared to the other two locations. The correlations between the demographic variables and cortisol levels suggest that differences in group composition do not have a great influence on stress levels. There appears to be, however, an influence of the number of groups per site on the stress levels. Other factors, such as deforestation, and habitat fragmentation, may also influence stress levels of black howler monkeys. This is an investigation carried out under the framework contract for access to genetic resources MAE-DNB-CM-2016-0046-M-0002 awarded to Stella de la Torre.

Key words: *Alouatta palliata*, black howler monkey, stress levels, fecal cortisol, demographic factors, Puyango, Pacoche, Lalo Loor, Ecuador.

TABLA DE CONTENIDO

Resumen	5
Abstract	6
Índice de tablas	8
Índice de figuras	9
Introducción.....	10
Métodos.....	14
Resultados	17
Discusión	19
Conclusiones.....	24
Agradecimientos	25
Referencias Bibliográficas	26
Anexo 1: Tablas	29
Anexo 2: Figuras.....	33
Anexo 3	38
Anexo 4.....	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparaciones múltiples de medias de Tukey de las tres localidades.....	29
Tabla 2. Tamaño y composición grupal de <i>A.palliata</i> en Puyango.....	29
Tabla 3. Tamaño y composición grupal de <i>A.palliata</i> en Pacoche.....	30
Tabla 4. Tamaño y composición grupal de <i>A.palliata</i> en Lalo Loor.....	31
Tabla 5. Coeficiente de correlación de Pearson entre las concentraciones promedio de cortisol fecal y el número de hembras adultas, machos adultos, juveniles y crías en cada población.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de caja y bigote de los niveles de cortisol fecal de los monos aulladores negros según su localidad.....	33
Figura 2. Composición Grupal de machos y hembras de <i>A.palliata</i> en Puyango.....	34
Figura 3. Composición Grupal de edad de <i>A.palliata</i> en Puyango.....	34
Figura 4. Composición Grupal de machos y hembras de <i>A.palliata</i> en Pacoche.....	35
Figura 5. Composición Grupal de edad de <i>A.palliata</i> en Pacoche.....	35
Figura 6. Composición Grupal de machos y hembras de <i>A.palliata</i> en Lalo Loor.....	36
Figura 7. Composición Grupal de edad de <i>A.palliata</i> en Lalo Loor.....	36
Figura 8. Correlación entre los niveles promedio de cortisol fecal y el número promedio de grupos en cada localidad.....	37

INTRODUCCIÓN

El mono aullador negro, *Alouatta palliata aequatorialis*, es un primate de la familia Atelidae. También es conocido como aullador de la costa. Esta especie está distribuida desde el sureste de México y Guatemala hasta la costa occidental de Colombia y Ecuador. En el Ecuador, habita en una gran variedad de ecosistemas tropicales, como bosques húmedos, secos y semihúmedos. Normalmente se lo puede encontrar a menos de 800 metros de altitud, sin embargo, es posible hallarlo hasta los 2200 msnm. Está presente en bosques primarios, secundarios y en zonas de recuperación y con altos niveles de intervención humana (Tirira et al., 2018). Su alimentación se basa especialmente en hojas, pero también consumen algunos frutos, néctar y flores. El fruto con el que más se alimentan son los higos (Vallejo & Boada, 2018).

Actualmente los aulladores negros sufren de una pérdida de su hábitat generada por una rápida fragmentación del hábitat, que es causada por incendios, deforestación, asentamientos humanos y zonas agrícolas, provocando que grandes fragmentos de bosque continuo se transformen en “islas” verdes pequeñas. Los monos aulladores negros son muy selectivos en cuanto a la vegetación que consumen, pero cuando se encuentran en zonas perturbadas, la selectividad alimenticia disminuye tanto en número como en variedad de especies vegetales, lo que hace que los aulladores empiecen a alimentarse con especies que no son parte de su dieta común. Debido a esta escasez y perturbación de su hábitat, *A.palliata* debe aplicar nuevas estrategias para poder adecuarse al nuevo medio (Aguilar et al., 2011). La alta densidad poblacional humana y la extracción continua de recursos forestales nativos, son motivos para que los bosques de la Costa del Ecuador sean considerados como uno de los ecosistemas más amenazados de todo el país, afectando a las poblaciones de *A.palliata*. Existen también otro tipo de actividades humanas, entre ellas la cacería y el tráfico de animales vivos, que ponen en riesgo a estos

primates. Cabe mencionar que los aulladores negros son especialmente sensibles a las enfermedades infecciosas, como por ejemplo la fiebre amarilla, que ha causado muertes masivas en varias poblaciones. Por estas razones, en Ecuador esta especie se considera En Peligro (Tirira et al., 2018).

Los monos aulladores negros viven en grupos, en los que el número de individuos varía desde 2 hasta 22 animales (Bruno, 2011). Estos grupos están compuestos por hembras y machos adultos, juveniles y crías. Normalmente hay un macho y varias hembras, aunque también puede haber algunos machos solitarios (García, 2009). Se conoce también que hay grupos que pueden alcanzar un mayor tamaño, llegando a tener hasta 45 individuos (Jara, 2008). Una potencial sobrepoblación en los remanentes del bosque, y a su vez la explotación y aumento de la demanda de la vegetación para usos alimenticios, podrían causar escasez del alimento. Estos cambios en la densidad de la población y del alimento muchas veces conllevan a una pérdida de la cohesión grupal, provocando una disgregación o “desintegración familiar”, en donde los grupos se empiezan a dividir, de forma que pueden abarcar una mayor cantidad de territorio para encontrar alimento. El problema está cuando los grupos se disgregan y todos habitan en un área fragmentada o reducida, porque se genera una competencia adicional por territorio. Como un efecto de esta competencia, los monos aulladores negros incrementan sus niveles de estrés, lo que a futuro puede repercutir en su estado de salud (Aguilar et al., 2011).

El estrés se define como un conjunto de reacciones fisiológicas que son moduladas por la liberación de hormonas glucocorticoides (GCs), desencadenada por estresores, que son factores ambientales percibidos por el animal como una amenaza. A corto plazo, la liberación de los glucocorticoides permite que el individuo sea capaz de enfrentar un evento estresante, lo cual es un efecto positivo, porque permite que el individuo sea capaz

de enfrentar un evento estresante. Sin embargo, a largo plazo la liberación continua o frecuente de estas hormonas, genera efectos negativos para la salud (Aguilar-Cucurachi et al., 2011). Debido a esto, es importante entender las respuestas fisiológicas de los animales frente a los factores que representan fuentes de estrés. Se han desarrollado técnicas no invasivas para medir los niveles de hormonas de estrés en la orina y en las heces (Behie et al., 2010). En los primates, al igual que en varios mamíferos, el cortisol es el glucocorticoide principal, el cual se transporta en la sangre, ya sea que se encuentre unido a globulinas específicas o de forma libre, y eventualmente es excretado en las heces (Brousset et al., 2005).

El estrés continuo en las poblaciones silvestres de animales, como los primates, es un factor que, al afectar el estado de salud de los individuos, tiene consecuencias negativas a largo plazo en la viabilidad de sus poblaciones (Vegas-Carrillo, 2008; Galindo, 2016). En este contexto, en mi investigación busqué estimar los niveles de estrés medidos a través del cortisol fecal de los aulladores negros de tres localidades de la costa del Ecuador diferencialmente afectadas por deforestación y fragmentación, Pacoche, Puyango y Lalo Loor, y relacionarlos con factores demográficos, como el tamaño y composición grupal y el número de grupos en cada localidad.

Objetivo General

El objetivo general de este estudio es evaluar si las diferencias de tamaño y composición grupal, y el número de grupos tienen influencia en los niveles de estrés de *Alouatta palliata aequatorialis* de tres localidades de la costa del Ecuador.

Objetivos Específicos

Identificar si existen diferencias en los niveles de cortisol fecal entre los individuos de las poblaciones de estudio.

Evaluar en qué medida las diferencias en las variables demográficas entre poblaciones influyen en los niveles de cortisol fecal, como indicador de estrés de los aulladores negros (*Alouatta palliata aequatorialis*).

MÉTODOS

Área de Estudio

Los datos fueron registrados en tres localidades de la costa del Ecuador. Pacoche se encuentra en el centro de la provincia de Manabí, es un Refugio de Vida Silvestre y Marino Costera y cuenta con una superficie de 5.096,42 hectáreas terrestres. Dentro de este Refugio existen bosques deciduos y semideciduos, en los cuales habitan una gran cantidad de plantas nativas (Montilla et al., 2017). Su microclima proporciona un ambiente adecuado para que varios mamíferos puedan vivir, como los monos aulladores y los capuchinos, además de aproximadamente 250 especies de aves, de las cuales 55 son endémicas (Greenearth, 2020). El incremento de la densidad poblacional humana en el sector ha generado una gran demanda de uso de los recursos forestales y degradación de los sistemas ecológicos (Montilla et al., 2017).

El Bosque Protector Puyango se encuentra ubicado en el sur del Ecuador, entre Loja y El Oro. Fue nombrado Bosque Protector en enero de 1987, además de ser nombrado Patrimonio Cultural del Ecuador (UNESCO, 1988). El Bosque Puyango tiene una extensión de 26 km² aproximadamente (Cabrera, 2020), siendo considerado como uno de los bosques secos más amplios de todo el país. Puyango está compuesto por un bosque deciduo y ciertos parches de bosque semideciduo, aunque existe una gran área de bosque secundario. El área de Puyango ha sido muy deforestada, y se han utilizado sus terrenos para implementar zonas de cultivo y de pastoreo (Acosta, 2014).

La Reserva Bosque Seco Lalo Loor se encuentra en Manabí, dentro de la Ruta del Spondylus (E15). Tiene aproximadamente 250 hectáreas y es un bosque primario tropical (Mendoza, 2017). La fundación Ceiba ha realizado un acuerdo de conservación con el fin de proteger este bosque y a su vez poder desarrollar el área como un sitio turístico y educativo (CFTC, 2016). Lalo Loor es una zona con una alta biodiversidad, ya que

comprende una fauna variada, con una gran diversidad de aves y vegetación con varias especies endémicas. Es también el hogar de varias especies que se encuentran en peligro de extinción, por lo que es una zona ambientalmente sensible. Una amplia zona de Lalo Loor fue deforestada hace años, hoy estas zonas están en proceso de regeneración (Mendoza, 2017).

Colección de datos

Cabe recalcar que no fui partícipe del trabajo de campo ni de laboratorio, pero utilicé la información de los censos y de los análisis de laboratorios para mi estudio.

Toma de muestras de heces:

Las muestras de heces fueron tomadas en junio de 2017 de varios individuos de grupos de las tres localidades. Cada muestra fue guardada en un vial con alcohol al 96% en condiciones de sombra. Después del trabajo de campo, todas las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Biología Molecular de la USFQ donde fueron procesadas para extraer y medir el cortisol fecal con el Protocolo EIA kit de Oxford Biomedical (Anexo 3).

Variabes demográficas:

En cada localidad, un equipo de dos a tres investigadores realizó censos diarios, temprano en la mañana (06h00 a 09h00) y en la tarde (15h00 a 18h00) en los senderos ya existentes, a una velocidad constante de aprox. 1 km/h. Al observar un grupo de primates se registró la fecha y hora de observación, la especie observada, las coordenadas de ubicación y el número de hembras, machos, juveniles, crías e individuos cuyo sexo y edad no pudieron ser identificados. Con base en el tamaño y composición grupal y la ubicación de cada

avistamiento fue posible diferenciar a los grupos por lo que, en algunas observaciones la identidad de cada grupo también fue registrada. Se incluyeron también comentarios adicionales que permitieron, entre otras cosas, identificar a los diferentes grupos de primates de cada localidad.

Análisis Cuantitativos:

Realicé un ANOVA de una vía para comparar los niveles de cortisol fecal entre las tres poblaciones utilizando RStudio, después de confirmar la homogeneidad de la varianza con la prueba de Levene. El análisis de la composición grupal se basó en las siguientes proporciones: adultos hembras vs adultos machos y adultos vs juveniles y crías. Calculé la media, la moda y la desviación estándar para el tamaño de grupos por localidad. Finalmente, realicé una correlación de Pearson entre los niveles promedio de cortisol fecal y el número de grupos por localidad. Realicé también correlaciones entre cada uno de los radios relacionados con la composición grupal y los niveles promedio de cortisol fecal para las tres localidades.

RESULTADOS

Niveles de cortisol

Encontré diferencias significativas en las concentraciones de cortisol final entre las tres poblaciones ($F_{2,18} = 4.72$, $p = 0.0225$). Las concentraciones de cortisol fueron significativamente más altas en las muestras de Lalo Loor. En la localidad de Puyango hay sólo cuatro datos, sin embargo, estas concentraciones de cortisol son relativamente altas. Mientras que los grupos de monos aulladores negros de Pacoche tienen concentraciones de cortisol más bajas que las otras dos localidades (Figura 1). La prueba pos hoc de Tukey (Tabla 1) evidencia que las diferencias significativas se dan entre las concentraciones de cortisol de Lalo Loor y Pacoche.

Tamaño y composición grupal

En Puyango se registraron 4 grupos, de los cuales el Grupo 1 es el que tiene la mayor cantidad de individuos, con 9 individuos. El grupo más pequeño fue el Grupo 2 con tan sólo una hembra y un macho. La media de individuos por grupo en esta población fue de 6 individuos (± 0.89), la moda fue de 2 individuos por grupo. Existe un mayor porcentaje de adultos, considerando ambos sexos (machos y hembras), con un porcentaje de 62%, seguido de un 21% de juveniles y un 17% de crías. El 60% de los adultos fueron hembras, mientras que los machos adultos representan el 40% de la población (Tabla 2, figura 2 y figura 3).

En Pacoche se registraron 17 grupos. El grupo con una mayor cantidad de individuos fue el SM7 con 19 individuos. El grupo más pequeño fue el SM2 que corresponde a un macho solitario. La media del número de individuos por grupo en esta población fue de 9 (± 2.32).

En grupos como el B1, SM3 y HB1 se registraron individuos no determinados, es decir que no se pudo identificar el sexo ni la edad de los mimos. En esta población el 68% de los individuos correspondió a animales adultos. Los juveniles y las crías representaron el 15% y el 17%, respectivamente. El 66% de los individuos adultos fueron hembras, mientras que los machos adultos representaron el 35% restante (Tabla 3, figura 4 y figura 5).

En Lalo Loor se registraron 21 grupos. El grupo con una mayor cantidad de monos fue el Grupo C5, con 20 individuos, en donde 9 no pudieron ser identificados en cuanto a su sexo y edad. Cabe mencionar que hubo varios individuos no determinados en la mayoría de los grupos registrados, siendo esta categoría la que tiene el mayor número de registros. Por otro lado, los grupos C8 y M2, sólo tuvieron un individuo, donde en ambos casos, era un macho solitario. La media de individuos por grupo en esta población fue de 8.24 (± 1.8). La categoría de edad en la que se registraron más individuos fue la de adultos (68%). Los juveniles y las crías tienen muy poca diferencia entre sí, siendo la categoría de las crías ligeramente mayor por representar un 17%, mientras que los juveniles representan un 15%. Entre los adultos, las hembras representan un 63%, mientras que los machos adultos representan el 37% (Tabla 4, figura 6 y figura 7).

Encontré una correlación positiva y relativamente alta entre el promedio de la concentración de cortisol fecal y el número de grupos en cada localidad ($r = 0.60$). Esto sugiere que mientras el número de grupos aumento, los niveles de cortisol fecal también aumenta (Figura 8). Por otro lado, las correlaciones entre las concentraciones promedio de cortisol fecal y el número de hembras adultas, machos adultos, juveniles y crías en cada población fueron bajas (Tabla 5).

DISCUSIÓN

La media de las concentraciones de cortisol fecal en Lalo Loor es significativamente mayor que las medias de las otras dos poblaciones. Si bien es necesario ampliar el número de muestras para controlar por la variabilidad que existe en la concentración de cortisol fecal debido al sexo, edad y estado fisiológico de cada uno de los individuos de una población (Arnijas & Suárez, 2018), las diferencias encontradas podrían estar relacionadas con diferencias en algunas variables demográficas de cada población, en particular con el número de grupos, como se evidencia en la correlación positiva y relativamente alta entre las concentraciones promedio de cortisol fecal y el número de grupos en cada población. En un estudio realizado con el cortisol fecal de monos aulladores de manto (*Alouatta palliata mexicana*) en Los Tuxtlas, México, se determinó que el aumento en la densidad de la población de monos genera un aumento en su nivel de estrés porque también existe un incremento de las probabilidades de transmisión de enfermedades; y es importante recordar que los monos aulladores son especialmente sensibles a contraer enfermedades. Además de esto, cuando existe una mayor cantidad de la población, se genera una disminución de la disponibilidad del alimento, lo que ocasiona un estrés dietético y estrés social entre los individuos, principalmente entre los que viven en áreas fragmentadas (Vegas-Carrillo, 2008). En Colombia, se realizó otro estudio con monos aulladores rojos (*Alouatta seniculus*), en donde se encontró que estos primates son propensos a bajar sus defensas cuando sus niveles de estrés se elevan debido a una alta densidad en su población (Gómez-Posada et al., 2009). Incluso, se determinó que el mono aullador negro emplea más tiempo viajando y buscando alimentos cuando habita en áreas con una elevada densidad poblacional, en comparación con los monos que habitan en lugares con baja densidad poblacional. Estas

actividades limitan y reducen su tiempo de descanso, de forma que son propensos a presentar niveles de estrés más altos (Larriva, 2017).

Aún no se conoce completamente cada uno de los estresores potenciales que afectan directamente a los primates, sin embargo, se han identificado distintas situaciones y características que están relacionadas al aumento de estrés. Entre estas están los estresores naturales, que involucran las características físicas y químicas del ambiente en el que los individuos se encuentren (como la temperatura, la radiación, etc.) y factores característicos de los primates como es la densidad de la población y la inestabilidad social. Además, hay una influencia de factores característicos de otras especies, en donde se toma en cuenta la disponibilidad de recursos, los depredadores y los patógenos, entre otros (Vegas-Carrillo, 2008).

El número de grupos varía según la localidad en la que se encuentren, en Puyango se registraron únicamente cuatro grupos de monos aulladores negros, con no más de 9 individuos por grupo. En Pacoche se registraron 17 grupos con una mayor cantidad de monos por grupo. En Lalo Loor se registraron 21 grupos, siendo esta la localidad con mayor cantidad de individuos *A.palliata*. El tamaño de grupos también cambia según su localidad, en Puyango, que fue donde se registraron sólo cuatro grupos, el tamaño de cada grupo es relativamente pequeño. Mientras que, en Lalo Loor, los tamaños de los grupos son más grandes, llegando a tener hasta un máximo de 20 individuos. En la gran mayoría de grupos de las tres localidades, existe una mayor cantidad de hembras que de machos adultos, siendo éstas más del 50% de la población adulta en las tres localidades; además, los grupos de las tres localidades están compuestos por varias crías y juveniles, siendo las crías más abundantes que los juveniles, excepto en Puyango. Se conoce que *Alouatta palliata aequatorialis* presenta una gran variación en cuanto a la estructura de los grupos sociales. Existen principalmente tres tipos de grupos, que son las parejas heterosexuales,

un macho dominante y varias hembras, y los grupos que constan de varios machos y hembras. Existen también registros de individuos solitarios, en su mayoría machos, que buscan colonizar a nuevos grupos o que se mantienen solitarios porque fueron desterrados de los grupos a los que pertenecían (Jara, 2008). La estructura social de la mayoría de los grupos registrados en este estudio concuerda con una de las composiciones grupales más comunes de los monos aulladores negros, con un abundante número de hembras adultas, y varios machos adultos, además de algunos juveniles y crías (Duarte, 2007).

La media y la desviación estándar del número de individuos por grupo en Puyango son menores que en Pacoche y en Lalo Loor. Esto, sumando al menor número de grupos registrado en esta localidad, sugiere que esta población es la más afectada por deforestación y fragmentación.

Mis resultados sugieren que el número de grupos tiene cierta influencia en los niveles de cortisol fecal, mientras que las diferencias en la composición grupal no influyen en dichos niveles. Sin embargo, es claro que existen otros factores, no considerados en este estudio, que influyen sobre los niveles de cortisol. El hecho de que en Puyango el número y tamaño de grupos fueron los más bajos de las tres localidades, pero las concentraciones de los niveles de cortisol fecal son las segundas más elevadas después de los datos de Lalo Loor, sugiere que en esta localidad hay otros factores antrópicos, como deforestación y fragmentación de los bosques, que están afectando a estos primates (Acosta, 2014). Puede ser que la disminución de la población se deba a que los grupos de monos habitan en fragmentos de bosque degradados (Estrada & Coates-Estrada, 1988). Además, la supervivencia de las poblaciones depende de la cantidad y disponibilidad de recursos alimenticios, de forma que si el alimento disminuye por un empobrecimiento de la vegetación, el tamaño de los grupos de *A.palliata* también van a

disminuir. Al existir esta reducción de sus poblaciones y cambios en cuanto a su estilo de vida, los niveles de estrés de los monos van a aumentar (Rotta, 2016).

Por otro lado, los niveles altos de estrés en Lalo Loor si se los puede relacionar con el tamaño y número de grupos, aunque es importante tomar en cuenta que otros factores ambientales también podrían influir. Entre estos factores están la distribución y cantidad de los alimentos, las diferencias ecológicas de los hábitats y la presión por depredadores (Jara, 2008). En el caso de Lalo Loor, el grado de conservación es alto, por lo que hay una gran variedad de higueras, epífitas, orquídeas y árboles, pero considerando la alta densidad de aulladores en esa localidad, es posible que el alimento sea escaso, al menos durante ciertas épocas del año, generando competencias entre los grupos. Esto podría ocasionar estrés fisiológico en los individuos, que se verá influenciado por la falta de comida y por la territorialidad (Rangel-Negrín et al., 2011).

En Pacoche encontré los niveles de estrés más bajos, y aunque sea un área en donde la deforestación es una práctica masiva causada principalmente por pastoreo y agricultura; es la localidad más amplia de las 3, porque cuenta con 5.096,42 hectáreas terrestres (Montilla et al., 2017). Debido a esto, en este refugio habitan una gran cantidad de monos aulladores negros (Pacoche Lodge & Reserve, 2014), los cuales pueden dispersarse a lo largo de toda la localidad. Según un estudio, los monos aulladores negros pueden movilizarse de forma diaria entre 1 a 2 kilómetros para encontrar alimentos como frutas, flores, semillas y hojas verdes, este desplazamiento podría considerarse como una actividad en la que estos primates se relajan y liberan estrés, lo que da una posible explicación del porqué en esta localidad los niveles de estrés son bajos (Peralta, 2019).

En Puyango, aunque sólo se registraron 4 grupos, los niveles de estrés son los segundos más altos, y esto puede estar relacionado a que este bosque presenta un elevado nivel de fragmentación y deforestación (Acosta, 2014), de forma que esto podría ser la

principal razón del estrés de los monos en esta localidad. Si bien los monos aulladores negros presentan una capacidad elevada de adaptación ante perturbaciones en su hábitat, la fragmentación puede afectar negativamente a la supervivencia de los monos juveniles y de las crías. Aparentemente, la supervivencia de esta especie parece estar relacionada al tamaño del hábitat, de forma que la supervivencia será menor en individuos inmaduros, conforme el tamaño del fragmento vaya disminuyendo, y esto también afectará al éxito reproductivo (Larriva, 2017). Así mismo, la flora del lugar se verá afectada, probablemente, por los cambios en la lluvia o en la temperatura, lo que influye en la cantidad y calidad de alimento que las hembras consumen, a su vez esto afectará a la alimentación y supervivencia de las crías (Larriva, 2017). Las poblaciones de esta especie también dependen de la cantidad y disponibilidad de recursos alimenticios, de forma que si el alimento disminuye por un empobrecimiento de la vegetación, el tamaño de los grupos de *A.palliata* también van a disminuir. Al existir esta reducción de sus poblaciones y cambios, los niveles de estrés de los monos aulladores negros van a aumentar (Rotta, 2016).

CONCLUSIONES

Mis resultados sugieren que existen diferencias significativas en los niveles de cortisol fecal entre los individuos de las tres poblaciones de estudio. También sugieren que existe influencia del número de grupos en los niveles de estrés, ya que cuando el número de grupos por localidad aumenta, los niveles de cortisol fecal también lo hacen, pero esta relación no siempre se va a cumplir. Además del número de grupos, existe una influencia en los niveles de estrés de factores externos, como la deforestación, la fragmentación de su hábitat, la falta de alimento y la presión por los depredadores, entre otros.

Este estudio es una evaluación preliminar, en donde no hubo muchas muestras de heces y no fue posible muestrear a todos los individuos de todos los grupos en las tres localidades. Esto representa una limitación, por lo que se recomienda que se realicen más censos en donde se puedan tomar más muestras para así confirmar los resultados. Además, se recomienda que se realicen más investigaciones entre la relación del tamaño y composición grupal y el número de grupos de *Alouatta palliata aequatorialis* con los niveles de cortisol fecal, debido a que, en este estudio no se logró identificar el sexo ni la edad de los monos de los que se recolectaron las muestras de heces; lo que genera un sesgo en los resultados. Y al realizar más investigaciones referentes al tema, se podrán implementar técnicas o formas para disminuir los niveles de estrés de los monos aulladores negros.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque con su infinito amor me guía, me sustenta y me ayuda en los momentos más difíciles. Sin Dios nada de esto sería posible y sólo puedo decir que gracias a Él he cumplido esta meta, sigo adelante porque sé que Él va conmigo a donde sea que yo vaya, y es Dios quien pelea por mí. He podido ver milagros y su gran poder en cada momento durante toda mi carrera universitaria y no podría estar más agradecida. Dios, a ti te dedico este logro y te agradezco por permitirme vivir esta gran experiencia en la universidad y estudiar algo que realmente me apasiona.

A mi tutora, Stella de la Torre, quien me dio la oportunidad de desarrollar este proyecto y me ayudó y guió durante cada etapa, siempre con toda la disposición y paciencia, además de su cariño y dulzura, que la convierten en la gran persona y profesional que muchos admiramos.

A toda mi familia. Principalmente a mis padres, Irene Córdova y David Balseca, por su amor y apoyo incondicional, por su sacrificio y tiempo, por entenderme cuando estaba ocupada y cansada, por estar para mí en todo momento, por criarme con valores y principios que me hicieron la mujer que soy hoy. Gracias por darme y querer siempre lo mejor para mí, por no perder las esperanzas y por siempre creer en mí. Son mi ejemplo para seguir ¡Los amo infinitamente! A mi ñaño, David Alejandro Balseca, gracias porque, aunque me molestas como cualquier hermano molesta a su hermana, eres mi mejor amigo y estás ahí para mí, me entiendes y me consientes (aunque tú eres el menor). Gracias porque sé que puedo contar contigo para todo. Espero ser de ejemplo para tu vida, para que sigas siempre el buen camino y llegues a ser todo un profesional en lo que te apasione y te haga feliz. Y recuerda que ¡Siempre estaré para ti amándote y apoyándote! Y a mis abuelitos, Elena Medina y Héctor Córdova, porque, aunque no entienden completamente mi carrera, me apoyan siempre y me aman sin condición. Mamaelenita, Papatito, ustedes siempre van a ser mis grandes amores, los amo con todo mi corazón y anhelo que Dios llene de felicidad sus corazones durante muchos años más. Estaré ahí para ayudarlos en lo que necesiten y recordarles lo importante que son para mí y para toda la familia.

A Paytter, por siempre apoyarme, ayudarme y animarme, por creer en mí y luchar junto a mí en cada momento difícil. Gracias porque desde que te conozco, has estado ahí para mí, para alegrarme, para hacerme reír, para celebrar mis logros (los pequeños y los grandes), para abrazarme si estoy triste y también para secar mis lágrimas si lloro. Gracias por ser una parte muy importante de mi vida (A...A).

Al Laboratorio de Biotecnología de la USFQ. Especialmente a Andrea Montero y Lourdes Torres. También a Renato León y Alfredo Carranco. A los investigadores de campo: Daniela García, Daniela Larriva, Alejandro Rubio, Giovani Ramón y Camila Guillén. Gracias porque sin su ayuda y colaboración no hubiese sido posible realizar este proyecto. A Primate Action Funds – Conservation International, Grants COCIBA de Investigación. Y a contrato marco de acceso a recursos genéticos MAE-DNB-CM-2016-0046-M-0002 otorgado a Stella de la Torre.

Y finalmente, agradezco a cada una de las personas que conocí y a los amigos que hice dentro de la universidad durante estos maravillosos años dentro de la USFQ.

¡Muchas gracias a todos!

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, A. (Noviembre de 2014). *Diversidad y Composición de la Comunidad de Reptiles del Bosque*. Recuperado el 20 de Octubre de 2020 , de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/3842/1/112530.pdf>
- Aguilar, A., García, F., & Rovirosa, M. d. (Septiembre-Diciembre de 2011). Aullidos en la selva. *REVISTA DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA DE LA UNIVERSIDAD VERACRUZANA*, XXIV(3). Recuperado el 29 de Agosto de 2020, de <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol24num3/articulos/aullidos/>
- Aguilar-Cucurachi, M., Rangel-Negrín, A., Dias, P., Chavira, R., Boeck, L., & Canales-Espinosa, D. (2011). *Medición de glucocorticoides, como indicadores de estrés, durante la* (Vol. 12). (J. Miranda, & Z. Hirano, Edits.) Xalapa-Enríquez, México. Recuperado el 10 de Agosto de 2020
- Arnijas, C., & Suárez, M. (Marzo de 2018). Dominancia social, diferencias sexuales y niveles de cortisol fecal en monos aulladores. *REVISTA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES*, V(1). Recuperado el Octubre de 2020, de [file:///C:/Users/User/Downloads/17839-Texto%20del%20art%C3%ADculo-55531-1-10-20180328%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/User/Downloads/17839-Texto%20del%20art%C3%ADculo-55531-1-10-20180328%20(1).pdf)
- Behie, A., Pavelka, M., & Chapman, C. (2010). *Sources of Variation in Fecal Cortisol Levels in Howler Monkeys in Belize*. Departamento de Antropología, Quebec. Recuperado el 12 de Agosto de 2020
- Brousset, D., Galindo, F., Valdez, R., & Romano, F. (2005). Cortisol in saliva, urine, and feces: non-invasive assessment of wild mammals. *Veterinaria México*, 36 (3), 325- 337.
- Bruno, G. (2011). Aportes al conocimiento del Aullador Negro y Dorado (*Alouatta caraya*): un análisis de historia de vida fuera de su distribución natural. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Cabrera, S. (2020). *Bosque Petrificado de Puyango*. Obtenido de Viajandox: <https://ec.viajandox.com/puyango/bosque-petrificado-de-puyango-A990>
- CFTC (Ceiba Fundación para la conservación tropical) 2016. Bosque seco Lalo Loor. (En línea). Ec. Obtenido el 15 de octubre de 2020, de: <http://www.ceiba.org/>
- Duarte, P. (Enero de 2007). *Relaciones sociales entre machos Alouatta palliata en Los Tuxtlas, México: Variaciones en función de factores sociodemográficos y ecológicos*. Tesis doctoral , Universidad Autónoma de Madrid, Madrid. Recuperado el Octubre de 2020, de <https://www.uv.mx/personal/pdias/files/2011/03/Tesis-Doctoral-PEDRO-DIAS.pdf>

- Estrada, A. & Coates-Estrada, R. (1988). *Tropical rain forest conversion and perspectives in the conservation of wild primates (Alouatta and Ateles) in Mexico*. American Journal of Primatology 14: 325-327.
- Galindo, J. (2016). *Evaluación del nivel de estrés en leoncillos (Cebuella pygmaea) mediante la medición de cortisol en heces*. Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Quito. Recuperado el 10 de Agosto de 2020, de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/6031/1/129464.pdf>
- García, B. (2009). *Mono aullador negro (Alouatta pigra): una tropa en Yaxha, la ciudad Maya*. Recuperado el Noviembre de 2020, de Diversidad y un Poco de Todo : <https://www.diversidadyunpocodetodo.com/mono-aullador-negro-alouatta-pigra/>
- Gómez-Posada, C., Álvarez, Z., & Giraldo-Chavarriaga, P. (2009). *Densidad y estatus poblacional de monos aulladores rojos en un gradual, fragmento aislado, La Tebaida, Quindío, Colombia*. Pontifica Universidad Javeriana Bogotá, Facultad de Ciencias, Bogotá. Recuperado el Diciembre de 2020
- Greenearth. (2020). *Reserva privada de Pacoche*. Recuperado el 8 de Octubre de 2020, de Greenearth: <https://www.greenearthecuador.org/pacoche/>
- Jara, E. (2008). *Zonas de distribución, composición estructural de los grupos, tamaño y densidad de Alouatta palliata aequatorialis, en el Cerro Pancho Diablo de la Reserva Ecológica Manglares Churute*. Universidad del Azuay , Facultad de Ciencia y Tecnología y Escuela de Biología del Medio Ambiente , Cuenca . Recuperado el Octubre de 2020, de <http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/109/1/06591.pdf>
- Larriva, D. (2017). *Impacto de la fragmentación sobre el comportamiento de Alouatta palliata aequatorialis en los cantones Puyango y las Lajas*. Proyecto de Investigación, Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Quito. Recuperado el 15 de Diciembre de 2020, de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/6958/1/136059.pdf>
- Mendoza, C. (Noviembre de 2017). *LINEAMIENTOS ESTRATÉGICOS QUE FUNDAMENTEN EL DESARROLLO ECOTURÍSTICO EN EL BOSQUE PROTECTOR LALO LOOR, CANTÓN JAMA, PROVINCIA DE MANABÍ*. Recuperado el Octubre de 2020, de <http://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/694/1/TT72.pdf>
- Montilla, A., Reyes, A, & Agüero, E. (2017). Análisis de Deforestación en Ecosistemas Boscosos del Refugio de Vida Silvestre Pacoche, Manabí Manta, Ecuador. Revista de Investigación, 41(92), 74-94. Obtenido el 8 de octubre de 2020, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-29142017000300005&lng=es&tlng=es.

- Pacoche Lodge & Reserve. (2014). *Pacoche Lodge & Reserve*. Recuperado el 15 de Diciembre de 2020, de <http://www.pacoachelodge.org/esp/monos.php>
- Peralta, E. (2019). *Determinación de los factores antrópicos que afectan en el desplazamiento del *Alouatta palliata aequatorialis* “Mono Coto de Tumbes” en el área de Conservación Regional Angostura -Faical, Tumbes – Perú 2018*. Tesis , UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES, Facultad de Ciencias Agrarias , Tumbes. Recuperado el Octubew de 2020, de <http://repositorio.untumbes.edu.pe/bitstream/handle/UNITUMBES/751/TESIS%20-%20PERALTA%20PE%C3%91A.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Rangel-Negrín A, Dias PAD, Canales-Espinosa D. (2011). Respuestas hormonales de los primates mexicanos a factores socioambientales. En: Dias PAD, Rangel-Negrín A, Canales-Espinosa D (eds.). *La Conservación de los Primates en México*. Colección la Ciencia en Veracruz, Consejo Veracruzano de Ciencia y Tecnología, Xalapa (Ver.). Pp. 149-171
- Rotta, G. (2016). *ECOLOGÍA TRÓFICA DE LOS MONOS AULLADORES NEGROS Y DORADOS (ALOUATTA CARAYA, ATELIDAE) EN EL GRADIENTE LATITUDINAL DE LA SELVA DE INUNDACIÓN DEL RÍO PARANÁ MEDIO*. Tesis doctoral , Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, La Plata. Recuperado el Octubre de 2020, de http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/76873/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Tirira, D. G., S. de la Torre y G. Zapata Ríos (eds.). 2018. Estado de conservación de los primates del Ecuador. Grupo de Estudio de Primates del Ecuador / Asociación Ecuatoriana de Mastozoología. Publicación especial sobre los mamíferos del Ecuador 12. Quito.
- UNESCO. 1988. Decreto No. 3819. Funciones del Banco Central para la conservación del bosque petrificado Puyango. Obtenido el 16 de octubre de 2020, de http://www.unesco.org/culture/natlaws/media/pdf/ecuador/ecuador_decreto_3819_21_03_1988_spa_orof.pdf
- Vallejo, A. F. y Boada C. 2018. *Alouatta palliata* En: Brito, J., Camacho, M. A., Romero, V. Vallejo, A. F. (eds). *Mamíferos del Ecuador*. Version 2018.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Obtenido el 16 de octubre de 2020, de <https://bioweb.bio/faunaweb/mammaliaweb/FichaEspecie/Alouatta%20palliata>, acceso lunes, 30 de agosto de 2020.
- Vegas-Carrillo, S. 2008. *Efectos de la transformación del hábitat en la conducta y niveles de estrés de *Alouatta palliata mexicana**. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona. Barcelona.

ANEXO 1: TABLAS

Tabla 1. Comparaciones múltiples de medias de Tukey de las tres localidades.

	Diferencia	Límite inferior	Límite superior	Ajuste de P
Puyango-Pacocha	119.6167	-957.7698	1197.003	0.9568114
Lalo Loor-Pacocha	1002.7417	131.5589	1873.924	0.0227907
Lalo Loor-Puyango	883.1250	-214.7849	1981.035	0.1283397

Tabla 2. Tamaño y composición grupal de *A.palliata* en Puyango

Grupo	Hembras Adultas	Machos Adultos	Juveniles	Crías	Total
1	3	2	2	2	9
2	1	1	0	0	2
3	2	2	1	0	5
4	2	2	2	2	8

Fuente: Datos del censo realizado en Puyango en junio de 2017.

Tabla 3. Tamaño y composición grupal de *A.palliata* en Pacoche.

Grupo	Hembras Adultas	Machos Adultos	Juveniles	Crías	N.D.	Total
B1	4	1	1	2	3	11
SM1	4	1	0	4	0	9
SM2	0	1	0	0	0	1
SM3	4	3	0	5	3	15
B2	9	1	0	4	0	14
SM4	9	1	0	5	0	15
HB1	1	1	1	0	1	4
P1	1	1	6	1	0	9
SM5	8	2	1	4	0	15
L1	0	0	1	0	0	1
L2	0	0	1	0	0	1
PL1	6	2	2	6	0	16
PL2	2	0	0	1	0	3
SM6	2	1	0	2	0	5
SM7	9	1	4	5	0	19
B3.1	5	1	3	4	0	13
HB2	0	1	1	0	0	2

Fuente: Datos del censo realizado en Pacoche en junio de 2017.

Tabla 4. Tamaño y composición grupal de *A.palliata* en Lalo Loor.

Grupo	Hembras Adultas	Machos Adultos	Juveniles	Crías	N.D.	Total
C1	4	1	2	0	5	12
M1	2	2	1	1	1	7
M2	0	1	0	0	0	1
MR1	1	1	1	0	1	4
T1	5	2	0	0	8	15
T2	1	1	0	0	0	2
T3	1	1	1	0	2	5
T4	2	3	1	1	5	12
M3	2	2	2	2	3	11
C2	1	1	1	1	5	9
C3	2	1	0	1	0	4
MA1	2	1	2	1	7	13
C4	3	1	0	1	0	5
MR2	4	1	1	1	0	7
MA2	5	2	2	2	3	14
C5	4	2	1	4	9	20
C6	2	2	2	3	6	15
C7	2	1	0	0	0	3
C8	0	1	0	0	0	1
C9	4	1	0	1	0	6
T5	1	1	0	0	5	7

Fuente: Datos del censo realizado en Lalo Loor en junio de 2017.

Tabla 5. Coeficiente de correlación de Pearson entre las concentraciones promedio de cortisol fecal y el número de hembras adultas, machos adultos, juveniles y crías en cada población

	# hembras adultas / población	# machos adultas / población	# juveniles/ población	# crías/ población
Promedio cortisol fecal/población	-0.3	0.4	0.17	-0.24

ANEXO 2: FIGURAS

Figura 1. Diagrama de caja y bigote de los niveles de cortisol fecal de los monos aulladores negros según su localidad.

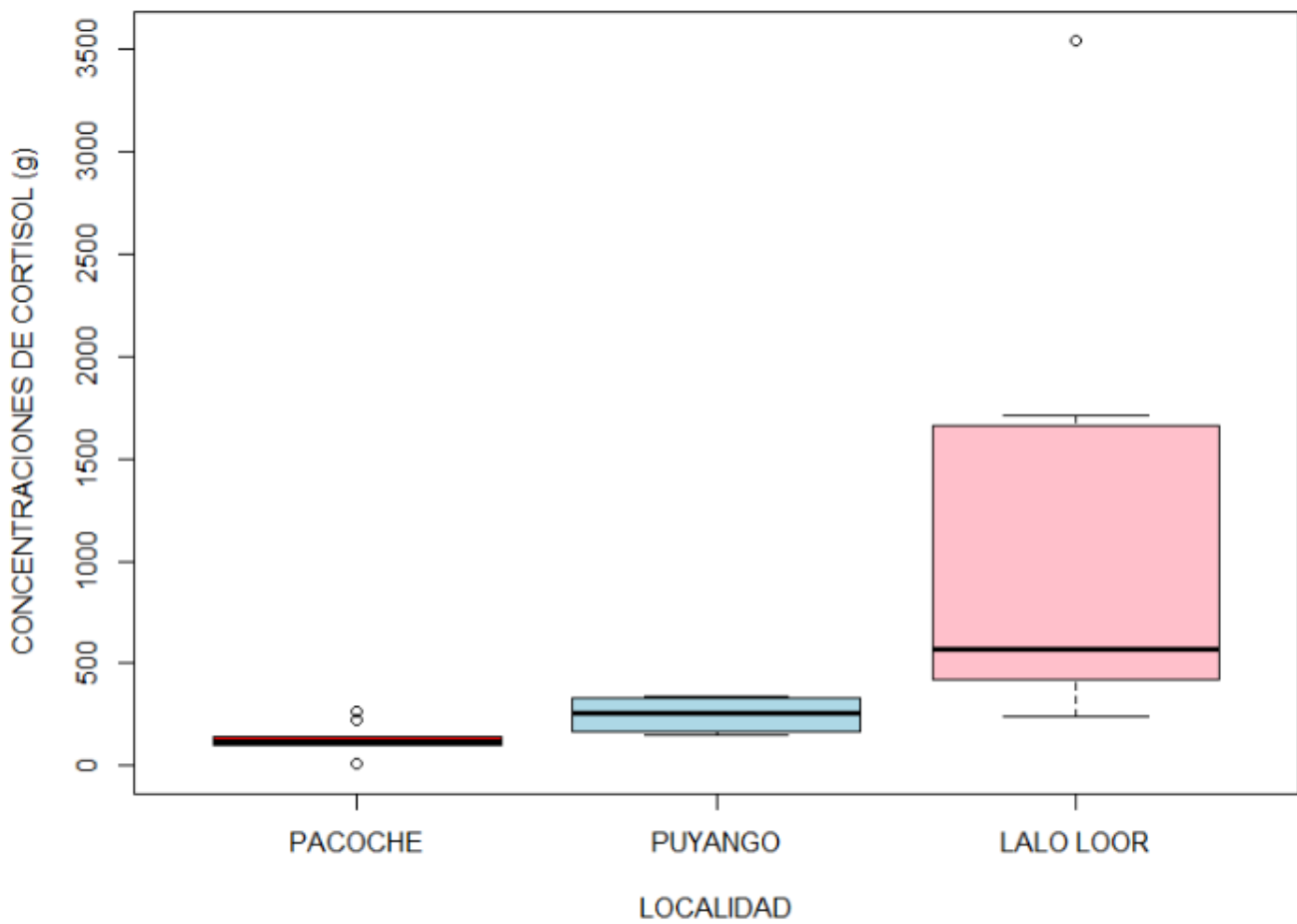


Figura 2. Composición Grupal de machos y hembras de *A.palliata* en Puyango.

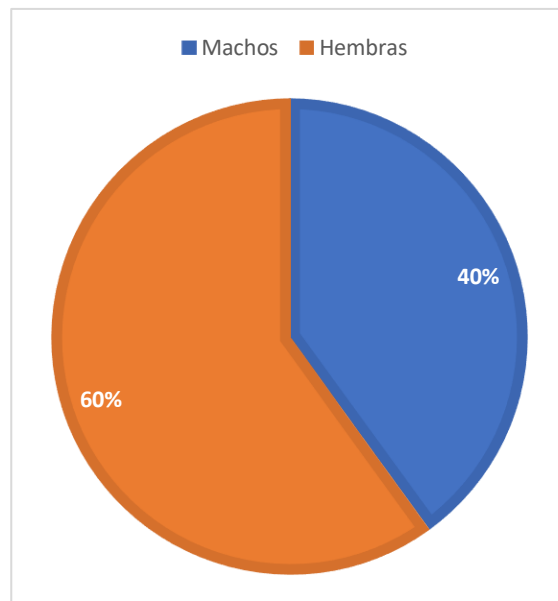


Figura 3. Composición Grupal de edad de *A.palliata* en Puyango.

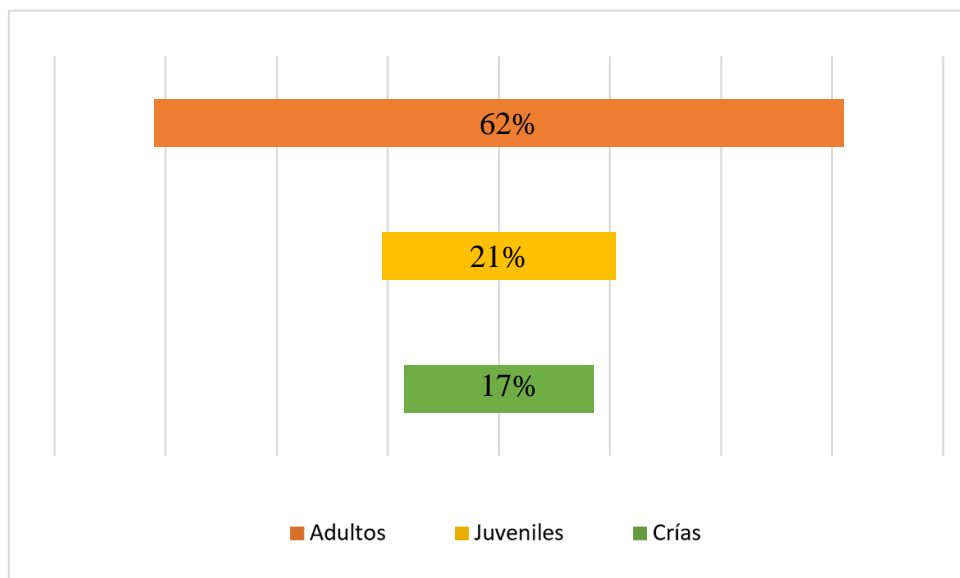


Figura 4. Composición Grupal de machos y hembras de *A.palliata* en Pacoche.

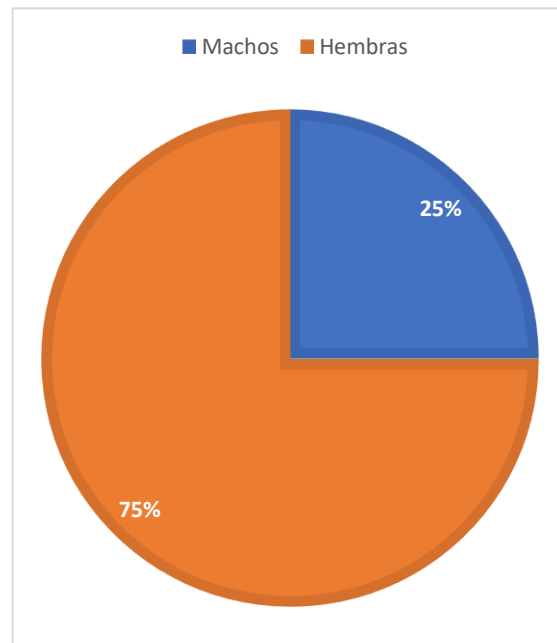


Figura 5. Composición Grupal de edad de *A.palliata* en Pacoche.

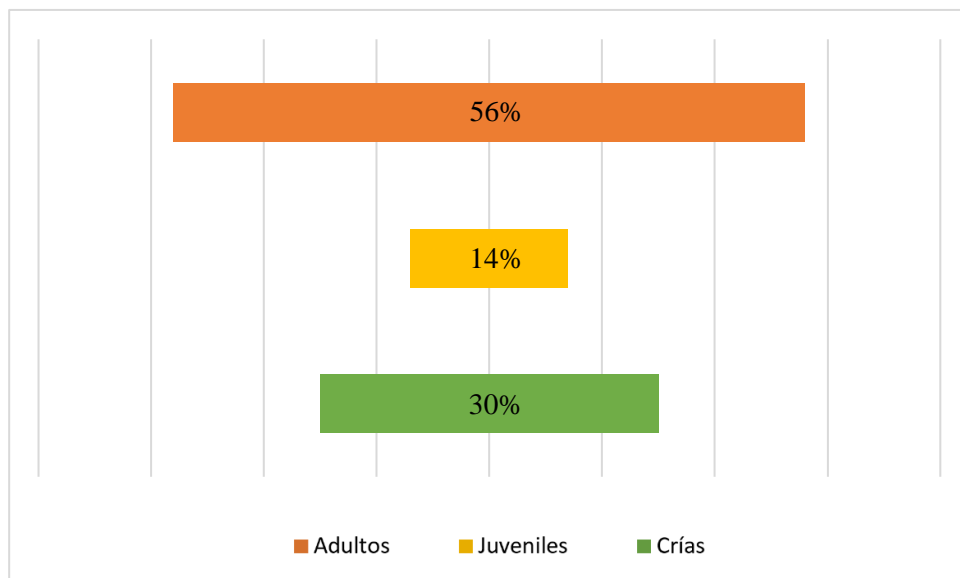


Figura 6. Composición Grupal de machos y hembras de *A.palliata* en Lalo Loor.

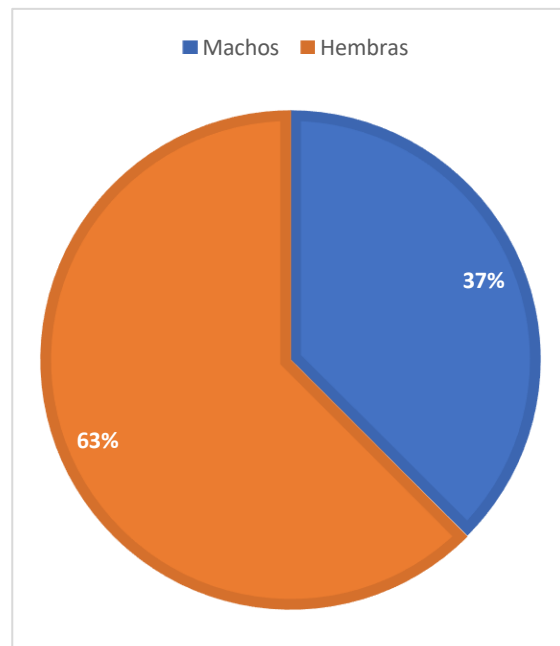


Figura 7. Composición Grupal de edad de *A.palliata* en Lalo Loor.

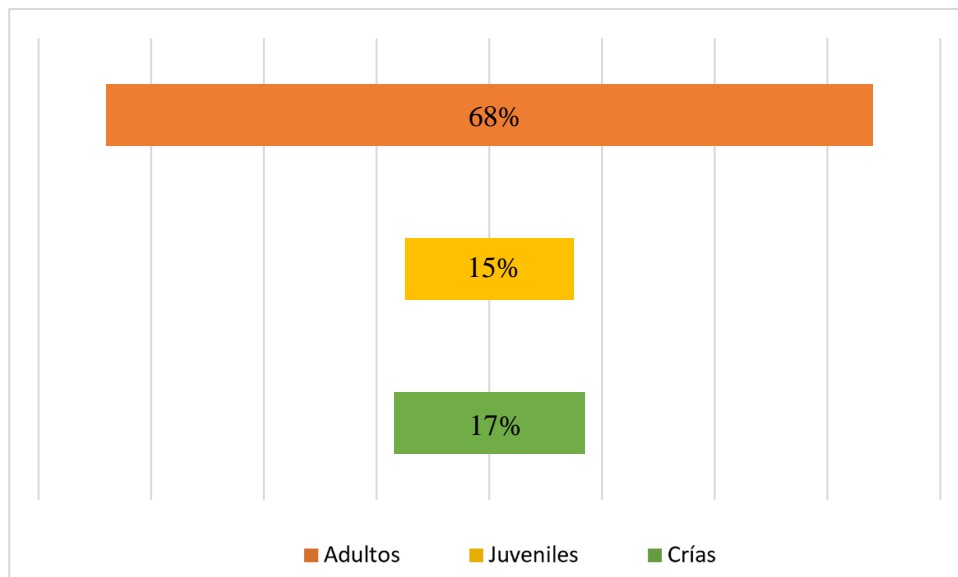
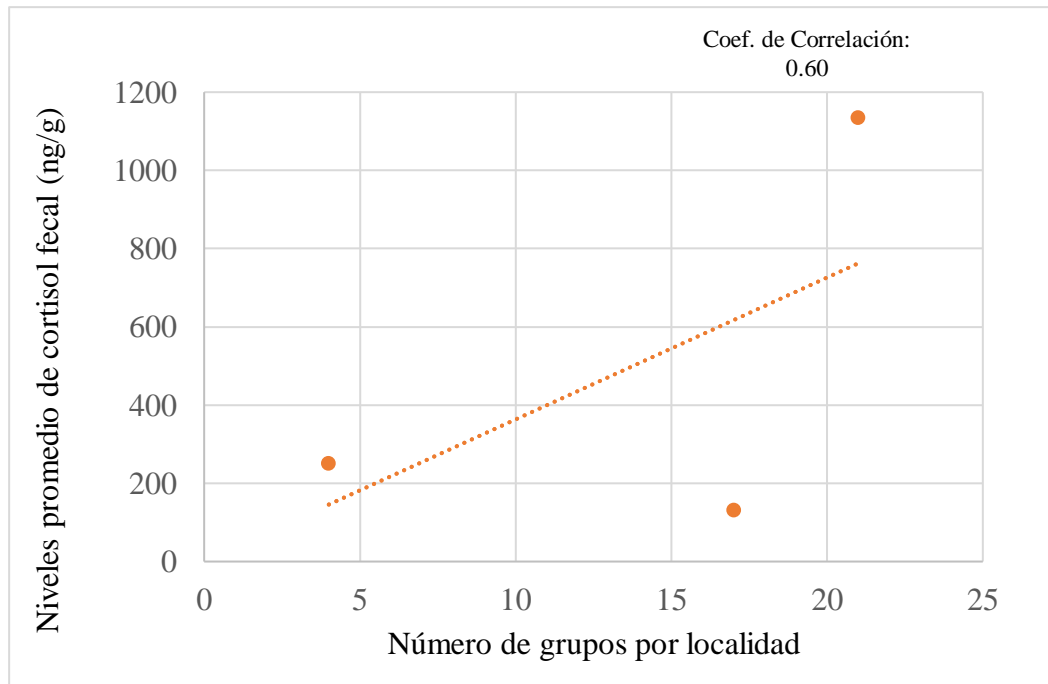


Figura 8. Correlación entre los niveles promedio de cortisol fecal y el número promedio de grupos en cada localidad.



ANEXO 3

Procesamiento de muestras de Heces

- Cada muestra debe ser colocada en una pesa objetos plástico en donde se pesará 1,0 gr de heces húmedas según la literatura recomienda.
- Se procede a secar cada muestra en una estufa (Laboratorio de botánica de la USFQ) a 30 grados centígrados por 6 horas aproximadamente.
- Dejar reposar las muestras una noche (12 horas) a temperatura ambiente.
- Pesar nuevamente las muestras secas, y triturarlas en un mortero.
- Realizar un tercer pesaje para obtener todas las muestras con un peso de 0,1 gr.
- Repartir en 4 porciones iguales cada una de las muestras pulverizados y depositarlos en 4 tubos Eppendorf® de 1,5 mL, luego agregar 625 uL de etanol al 96% en conjunto con 625 uL de agua destilada, para cada tubo.
- Poner cada tubo obtenido en el Vórtex por 10 minutos.
- Centrifugar a 13200 rpm por 20 minutos.

Preparación de muestras para el Test de ELISA

- Dentro de una cámara de flujo laminar, extraer 25 uL de sobrenadante de cada uno de los 4 tubos para obtener un volumen total de 100 uL, que se depositado en un tubo Eppendorf® de 0,2 mL.
- Colocar los tubos abiertos en una cama de arena a 60 grados centígrados por un tiempo de 4-5 horas o hasta que el líquido se evapore completamente.
- Añadir a cada uno de los tubos 100 uL de Buffer EIA (buffer de extracción), el cual debe ser obtenido del respectivo kit de ELISA.

- Realizar un spin en la centrifuga de 8 segundos a 13200 rpm.
- Realizar una dilución de 1:100, utilizando 10 uL de muestra en 990 uL de Buffer de extracción.
- Poner cada tubo en el Vórtex por 10 segundos aprox.

Elaboración del Test de Elisa

- Elaborar la curva estándar siguiendo las especificaciones del kit.
- Agregar en cada pocillo de la placa de ELISA 50 uL tanto de la curva estándar como de las muestras que se usarán para el análisis, todo por duplicado.
- Agregar 50 uL del conjugado a cada pocillo para dar un total de 100 uL en cada uno de los pocillos.
- Tapar la placa de ELISA y dejar reposar por una hora.
- Preparar mientras se espera el buffer de lavado, realizando una dilución en 1:10, en este caso sería 20 mL de Buffer de lavado en 180 mL de agua destilada.
- Después de la hora de reposo realizar 3 lavados del microplato con el Buffer de lavado, agregando 200 uL a cada pocillo cada vez.
- Posterior al lavado se debe agregar 150 uL del sustrato TMB en cada uno de los pocillos y dejar reposar por 30 minutos. (OJO, realizar este paso en un cuarto oscuro).
- Poner el microplato en el lector DYNEX MRX® (laboratorio de Enfermedades Tropicales de la USFQ) a una observancia de 650 nm o según el kit lo indique.

ANEXO 4

Concentraciones de cortisol obtenidas a partir de muestras de heces de monos aulladores.

Muestra	ng cortisol/ g muestra
PA1	103
PA2	268
PA3	116
PA4	7.9
PA5	224
PA7	116
PA8	116
PA9	139
PA10	99.3
PU1	154
PU2	338
PU3	187
PU4	328
LL13	237
LL15	465
LL22	585
LL 6	372
LL 10	1610
LL 25	3540
LL 26	1710
LL 27	560

Fuente: Datos obtenidos de los análisis de heces tomados en junio de 2017.

Media, moda y desviación de individuos para el tamaño de grupos en las tres localidades.

	Media	Moda	Desviación Estándar
Puyango	6	2	0.894427191
Pacocha	9	0	2.323790008
Lalo Loor	8.2	1	1.80800013

Prueba ANOVA de una vía de las concentraciones de cortisol fecal por localidad.

	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Varianza	Valor F	Pr (>F)
Localidad	2	4660359	2330180	4.722	0.0225 *
Residuales	18	8882962	493498		